

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA - FAV

RENATA SANTI YAMIM

SEXAGEM FETAL EM EQUINOS

BRASÍLIA – DF
2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA - FAV

RENATA SANTI YAMIM

SEXAGEM FETAL EM EQUINOS

Monografia apresentada à
Banca Examinadora da
Universidade de Brasília
como exigência final para
obtenção do título de Médico
Veterinário do curso de
Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira

BRASÍLIA – DF
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Yamim, Renata Santi.
Sexagem Fetal em Equinos. / Renata Santi Yamim, orientação
de Rodrigo Arruda de Oliveira – Brasília, 2013. 26 p.: il.

Monografia – Universidade de Brasília / Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

1. Sexagem fetal em equinos. 2. Relatório de Estágio.

Cessão de Direitos

Nome do Autor: Renata Santi Yamim

Título da Monografia de Conclusão de Curso: Sexagem Fetal em Equinos.

Ano: 2013

É concedida a Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósito acadêmico e científico. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Renata Santi Yamim

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Yamim, Renata Santi

Título: Sexagem Fetal em Equinos

Monografia de conclusão do Curso de
Medicina Veterinária apresentada à
Faculdade de Agronomia e Medicina
Veterinária da Universidade de Brasília

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira
Julgamento: _____

Instituição: Universidade de Brasília
Assinatura: _____

Prof. Dr. Ivo Pivato
Julgamento: _____

Instituição: Universidade de Brasília
Assinatura: _____

M. V. Ms. Francisco J. G. de Oliveira
Julgamento: _____

Instituição: Autônomo
Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta monografia aos meus pais amados, Chafic e Saraí que sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram em todas as minhas escolhas e decisões, igualmente ao meu irmão Eduardo, por ser sempre meu melhor amigo, à minha avó Margarida, por todo o amor que sempre me deu e me dá e a minha priminha Isabela, por ser minha princesinha e futura colega de profissão, me considerando um exemplo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade da vida do aprendizado e conhecimento.

Agradeço aos meus mascotes: Dame, Pointer, Max, Baby e Sherlock, que sempre me deram força e coragem para cuidar deles da melhor forma possível, mesmo muitas vezes apalpadados em excesso pela simples curiosidade ou excesso de zelo.

Agradeço aos amigos que ao longo do curso fiz e que com certeza ficarão para sempre em meu coração e se Deus assim permitir que continuem por perto por toda a minha vida, meu muito obrigada a todos principalmente a Aline que esteve sempre ao meu lado e continuou assim durante toda a caminhada mesmo com a transferência de instituição e os altos e baixos. Mas também não poderia esquecer a Rafa, Paradinha, Nathália, Louise, Leandro, Felipe, Emanuel por me chamar para acompanhá-lo a campo e Thágrid, pelo estágio.

Agradeço aos meus parentes que torcem por mim e estão inseridos no meu aprendizado, crescimento e conquistas. Principalmente ao meu tio Robinson, tia Lucynara, tia Sandra, aos primos Daniel, Rafael, Tânia, Leonardo, Priscila e Maysa que com certeza sempre torcerão por mim.

Agradeço aos professores, Júlio Roquete, Hélio Blume, Caíque, Helvécio, Soraya, Andrea e Záeida que ao longo da minha caminhada foram e continuam sendo exemplos, em especial ao professor Ivo Pivato e ao meu orientador Rodrigo Arruda por me abrirem a visão para as biotécnicas e reprodução animal.

Agradeço a todos que me ajudaram no meu estágio supervisionado, em especial a família Piazza Bittar por me acolherem como filha e irmã nos três meses da minha estadia em Goiânia, o meu muitíssimo obrigado. Agradeço também ao meu supervisor de estágio o médico veterinário Carlos Augusto Salvagni que com a maior boa vontade me acolheu e ensinou muito sobre a reprodução equina; agradeço também aos meus colegas de estágio Pedro Henrique e Samir pela companhia e por me fazerem rir a maior parte do tempo, tornando as viagens mais curtas e bem mais divertidas.

EPÍGRAFE

"Aprendi na vida a transformar o medo em desejo e o desejo em confiança. Aprendi que quando se quer conseguir algo, tem que dominar a razão e não a força. Aprendi como é bom chegar quando se tem paciência. Aprendi que acima de tudo, o importante é QUERER."

Amir Klinck

RESUMO

O crescimento exponencial da equideocultura nacional implica na necessidade da utilização de biotécnicas da reprodução, com o objetivo de aumentar a produção e facilitar o manejo nos criatórios. Uma dessas ferramentas é a sexagem fetal, que pode ser realizada em diversas fases da gestação, e que ainda é um recurso pouco utilizado na rotina dos haras. Objetivou-se nesta revisão descrever as principais técnicas de sexagem fetal abordadas na literatura que são: identificação do tubérculo genital, das gônadas fetais e do DNA fetal livre circulante.

Palavras-chave: biotécnicas da reprodução, equinocultura, gestação, sexagem fetal.

ABSTRACT

The exponential growth of the national equine breeding implies the necessity of using reproduction biotechniques, in order to increase production and facilitate management on stud farms. One of this is fetal sexing, which can be performed at different stages of pregnancy, and that is still so little used in routine stud farms. The objective of this review is to describe the main techniques for fetal sexing in mares reported in literature (genital tubercle, fetal gonad and free fetal DNA circulating).

Keywords: equine breeding, pregnancy, reproduction biotechniques, sexing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema da Sexagem pelo Tubérculo Genital	2
Figura 2 – Ultrassonografia para identificação do Tubérculo Genital	3
Figura 3 – Esquema de Sexagem pela gônada	4
Figura 4 – Ultrassonografia do sistema reprodutor do macho	5
Figura 5 – Ultrassonografia do sistema reprodutor do macho	6
Figura 6 – Ultrassonografia das glândulas mamárias	7
Figura 7 – Ultrassonografia de pênis ereto na fase fetal	8
Figura 8 – Ultrassonografia das gônadas em anatomia topográfica	9

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	2
2.1. Sexagem através da Identificação do Tubérculo Genital	2
2.2. Sexagem através da Identificação das Gônadas	3
2.3. Sexagem através do DNA Fetal Livre Circulante	10
3. Conclusão	13
4. Referência Bibliográfica	14
5. Relatório de Estágio	17
5.1. Atividades Realizadas	17
5.2. Controle folicular e manipulação farmacológica do ciclo estral	18
5.3. Inseminação Artificial	20
5.4. Transferência de Embrião	21
5.5. Colheita de Sêmen	23
5.6. Congelamento de Sêmen	24
6. Conclusão	27

1 - INTRODUÇÃO

O complexo do agronegócio dos equídeos no Brasil gera cerca de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos, movimenta mais de R\$ 7,5 bilhões anuais na economia, e possui uma tropa de aproximadamente 5,6 milhões de cabeças. Somente em 2011 foi arrecadada uma quantia de aproximadamente R\$ 400 milhões em leilões de cavalos contra R\$ 22,5 mil em 1995 (LIMA et al., 2012).

A profissionalização e o crescimento da equideocultura criam a necessidade de cada vez mais utilizar as biotécnicas da reprodução, com o objetivo de aumentar a produção e facilitar o manejo. Uma dessas ferramentas é a sexagem fetal, que pode ser realizada em diversas fases da gestação, e que ainda é um recurso pouco utilizado na rotina dos haras.

A determinação do sexo fetal deve se tornar uma prática comum na criação de equinos, já que a técnica é de fácil execução e auxilia no manejo, pois ajuda na determinação e insistência em determinados cruzamentos; na estimativa orçamentária a ser empregada; na introdução ou não de animais em leilões; influência no valor do produto; planos de venda; além de decidir o quanto antes o garanhão que será utilizado em seu plantel (BUCCA, 2005).

O diagnóstico ultrassonográfico na gestação de equinos teve início na década de 80. Em 1989 foi realizada a primeira descrição de sexagem fetal através do tubérculo genital no terço inicial da gestação (CURRAN & GINTHER, 1989). Cerca de onze anos mais tarde foi relatado a sexagem através das gônadas e genitália externa (RENAUDIN, 2000), realizada quando os fetos atingem o terço médio da gestação. O último método e mais recente para a sexagem fetal é pelo DNA fetal circulante, que até então é realizado no terço final da gestação (LEON et al., 2012).

Objetivou-se nesta revisão descrever essa biotécnica, assim como abordar a anatomofisiologia da sexagem fetal em éguas, mediante as três formas descritas na literatura.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SEXAGEM ATRAVÉS DA IDENTIFICAÇÃO DO TUBÉRCULO GENITAL

O tubérculo genital é o processo embrionário que dará origem ao pênis nos machos ou ao clitóris nas fêmeas. A morfologia ultrassonográfica em machos e fêmeas é idêntica, sendo uma estrutura hiperecoica, bilobulada com formato oval e alongado de aproximadamente dois milímetros de diâmetro quando observado entre 40 e 54 dias de gestação, considerando o dia da fecundação como dia zero. Durante a diferenciação o tubérculo se desloca da sua posição inicial, entre os membros posteriores, em direção ao cordão umbilical, nos machos, e em direção à base da cauda, nas fêmeas (CURRAN & GINTHER, 1989) (Fig.1).

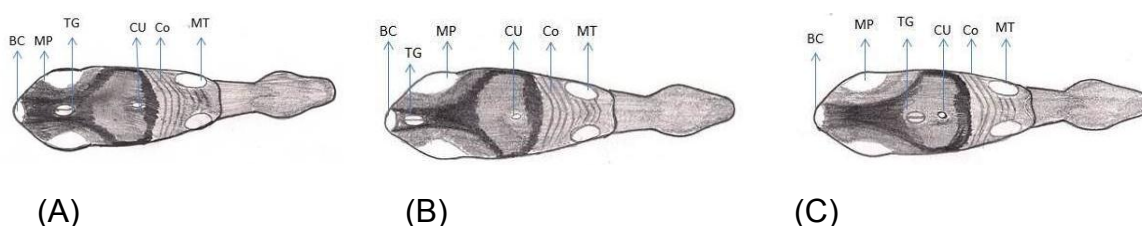


Figura 1 – Sexagem pelo tubérculo. A) Tubérculo com 53 dias indiferenciado. B) Tubérculo próximo à base da cauda (Fêmea); C) Tubérculo próximo ao cordão umbilical (Macho). Bc, base da cauda; MP, membros pélvicos; TG, tubérculo genital; CU, cordão umbilical; Co, costelas; MT, membros torácicos.

Fonte: Arquivo Pessoal/ Renata Yamim.

CURRAN & GINTHER (1989) verificaram que a primeira visualização do tubérculo ocorre com aproximadamente 53 dias. Sendo que o período para a melhor identificação é entre 59 a 68 dias, pois já ocorreu a migração do tubérculo. Antes dos 53 dias é difícil a identificação devido o posicionamento do tubérculo e o tamanho do feto interferindo no posicionamento do transdutor. Dependendo do plano de observação é possível traçar um triângulo, onde os vértices se encontram no tubérculo genital e nos membros posteriores uma vez que a tíbia é uma estrutura visível e de possível identificação (HOLDER, 2000) (Fig. 2).

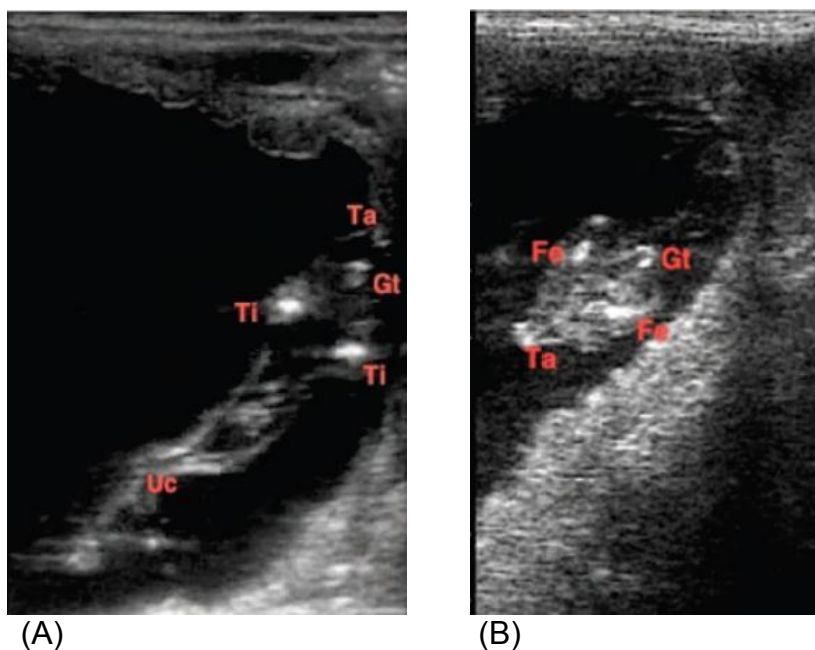


Figura 2 – (A) Fêmea com 62 dias de gestação. Uc- Cordão umbilical; Ti – Tíbia; Ta – cauda; Gt – Tubérculo Genital. (B) Macho com 65 dias de gestação, Fe- Fêmur. Fonte: Livini (2010).

Após o dia 69 até aproximadamente o dia 97 é difícil à identificação do tubérculo, pois com o desenvolvimento da gestação a quantidade do líquido alantoideano aumenta, e o feto migra para uma posição mais ventral no útero, dificultando o posicionamento do transdutor (HOLDER, 2000).

Há mais erros de diagnósticos em fêmeas do que em machos, visto que o tubérculo pode estar encoberto pela base da cauda do feto dificultando ainda mais a identificação (MARI et al., 2002).

Com aproximadamente 90 dias o feto adota uma posição mais dorsal no útero, facilitando seu acesso, porém nesta fase o tubérculo é menos proeminente o que dificulta sua visualização. Já é possível notar a genitália externas como: pênis, prepúcio, glândula e gônadas nos machos e glândula mamária, clitóris e gônadas nas fêmeas (LIVINI, 2010).

2.2 SEXAGEM ATRAVÉS DA IDENTIFICAÇÃO DAS GÔNADAS.

A sexagem fetal através das gônadas (ovários e testículos) não é realizada só pela identificação das mesmas, mas sim em conjunto com a genitália

externa, como o pênis e clitóris, estruturas que foram originadas a partir do tubérculo genital (BUCCA, 2005).

As gônadas fetais são estruturas ovais com dois a sete centímetros de comprimento, dependendo do estágio da gestação, e com ecogenicidade semelhante ao fígado fetal. Nos machos possui uma aparência homogênea com uma linha fina central e longitudinal hiperecoico e ecogênica (representa o mediastino), pouco visível após os 125 dias de gestação. Quando em identificação frontal as gônadas situam-se na parte caudal e ventral do abdômen, ao longo dos membros pélvicos. Nas fêmeas, a gônada possui um círculo hiperecoico na parte central (representando a região cortical e medular), separado por tecido homogêneo e consistente até 133 dias. Após esta data, todo o círculo, metade ou uma pequena parte poderá ser identificada. Seu tamanho e localização são similares à gônada do macho (RENAUDIN et al., 1997) (Fig. 3).

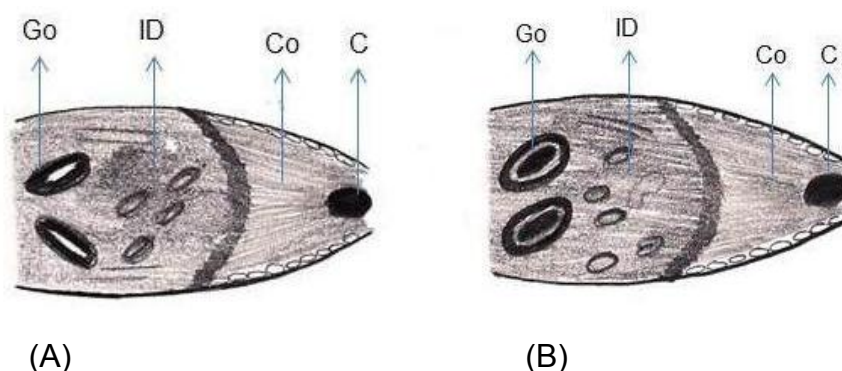


Figura 3 – Sexagem pela gônada. A) Macho; B) Fêmea. Go, gônadas; ID, intestino delgado; Co, costelas; C, coração. Fonte: Arquivo Pessoal/ Renata Yamim.

Para identificação da gônada deve-se determinar outras estruturas como o coração, cabeça e pescoço, caracterizando a parte cranial do feto. O formato de feijão do estômago fetal assim como sua ecogenicidade caracteriza a porção caudal do feto. A determinação do sexo é realizada pelo escaneamento total do abdômen caudal, membros posteriores e nádegas, para a identificação dos órgãos sexuais. Uma vez que os membros posteriores estão devidamente identificados e é possível em plano frontal realizar a visualização de toda a coluna vertebral. Com o transdutor posicionado paralelo a coluna em direção ventral, na parte caudal do abdômen é possível à observação das gônadas no abdômen fetal. A mesma é de fácil identificação, situa-se próximo a porção caudal dos rins,

que representam um bom parâmetro topográfico para o diagnóstico (BUCCA, 2005)

O feto pode se apresentar de forma anterior, posterior ou transversa. A postura do feto pode variar de acordo com sua movimentação, várias disposições de membros, pescoço e cabeça, flexionado e/ou estendidos serão identificados. Além destes, outras estruturas e imagens podem interferir na visualização da área desejada como estruturas ósseas fetais em movimento, causando sombras acústicas sobre o abdômen caudal do feto (BUCCA, 2005).

Características fetais masculinas identificadas incluem: gônadas, pênis e prepúcio; escroto e “bolsa testicular”; uretra. O pênis é visualizado caudal a base do cordão umbilical, encontra-se completamente ou parte dentro do prepúcio. Muitas vezes localiza-se em repouso em cima ou muito próximo do cordão umbilical onde a pulsação forte das artérias deste, podem movimentá-lo (LIVINI, 2010) (Fig.4).



Figura 4: Macho com 150 dias de gestação. HI, membros posteriores; Ur, Uretra; Sp, eixo do pênis; Pe, pênis. Fonte: Livini (2010).

A uretra é de fácil identificação ao longo do eixo ventral sendo uma estrutura hiperecoica ecogênica como duas linhas paralelas. Em corte transversal a imagem da uretra podem ser obtida no períneo masculino. O escroto fetal

possui uma ecogenicidade composta por bolsa escrotal simétrica e áreas ovais menos ecogênicas (BUCCA, 2005; LIVINI, 2010) (Fig. 5).

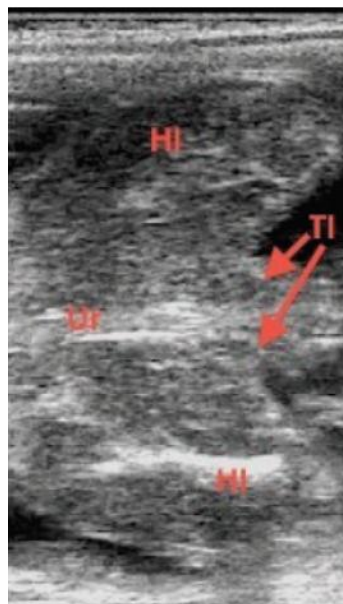


Figura 5 - Macho com 118 dias de gestação. Ur, uretra; HI, membros posteriores; TI, “alojamento testicular”. Fonte: Livini (2010)

Características fetais femininas identificadas incluem: gônadas; clitóris e vulva; glândula mamária e tetos. A glândula mamária pode ser visualizada na região pubiana com aparência triangular ou trapezoide com ecogenicidade uniforme. Os tetos emergem das bordas ventrais da glândula como dois grandes pontos hiperecoicos. Diferente dos machos onde a uretra se mostra em toda a sua extensão desde o pênis até o ânus, não há nenhuma estrutura de grande interesse no períneo ventral. O clitóris fetal é hiperecoico e se estende para fora das nádegas, posicionado acima no períneo, não deve ser confundido com o ânus localizado próximo a base da cauda. Em corte transversal oblíquo é possível identificar a comissura vulvar entre o ânus e o clitóris. As gônadas possuem uma parte interna e uma externa, que posteriormente serão chamadas de cortical e medular, bem diferenciada e dividida por uma fina linha concêntrica com boa identificação no exame ultrassonográfico (BUCCA, 2005; LIVINI, 2010) (Fig. 6).

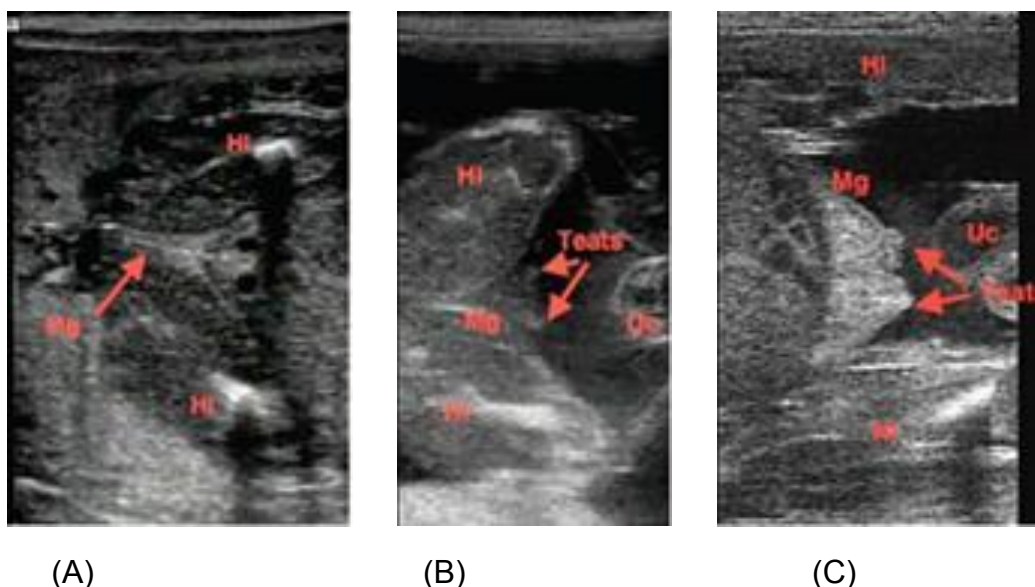


Figura 6: Fêmeas com 110, 114 e 185 dias A, B e C respectivamente. Mg, Glândula Mamária; HI, Membros posteriores; Uc, Cordão Umbilical; *Teats*, Tetos. Fonte: Livini, (2010).

A partir de 100 dias de gestação, o aumento do tamanho do feto pelo desenvolvimento permite a identificação de suas estruturas bem como o posicionamento agora de volta a região pélvica, facilitam a identificação das estruturas de interesse. Os ovários e testículos têm um crescimento considerável entre 90 e 270 dias de gestação pela hipertrofia e hiperplasia de células da camada interna da gônada, inicialmente iguais em machos e fêmeas (NAVES et al, 2008).

O período de identificação do prepúcio e pênis nos machos vai de 100 a 240 dias, nas fêmeas a identificação da glândula mamária e dos tetos é melhor de 118 a 227 dias de gestação. Nas fêmeas antes de 118 dias os tetos são muito pequenos para identificação no exame detalhado dos membros pélvicos e também pela movimentação excessiva do feto nesta fase. Após os 200 dias de gestação é cada vez mais difícil a identificação da genitália externa em ambos os sexos, já que os fetos se encontram grandes demais para a visualização por completo da região de interesse (RENAUDIN et al., 1997).

RENAUDIN et al.(1997) foram os primeiros a relatar ereção fetal, em um dos fetos observados, aos 194 dias de gestação, que é considerado um comportamento normal em fetos humanos (Fig. 7). Nas fêmeas foi identificada a

glândula mamária com os dois tetos, sendo uma estrutura hiperecoica com formato triangular como a rafe perineal, entre 133 e 227 dias de gestação.

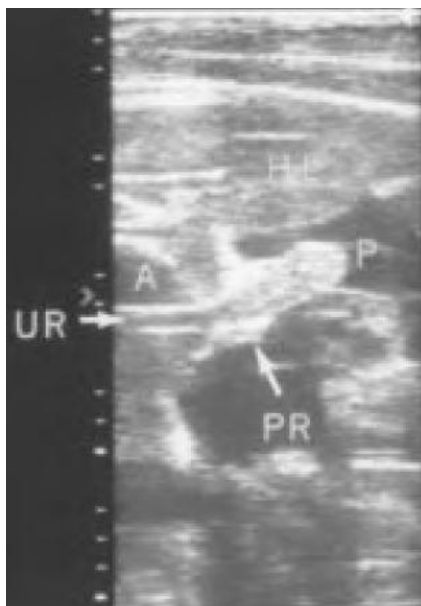


Figura 7 – Macho com 194 dias de gestação. Pênis ereto. P, pênis; PR, prepúcio; A, abdômen; UR, úraco; HL, membro posterior. Fonte: Renaudin (1997).

Após esta data a identificação sexual torna-se muito difícil, pois o feto já se apresenta em posição anterior, ficando os membros pélvicos localizados no abdômen da mãe (RENAUDIN et al., 1997).

A diferença ultrassonográfica entre a gônada masculina e feminina tem uma melhor janela de diferenciação entre 100 e 130 dias. Nesta época o feto é facilmente acessado, seu tamanho e posicionamento possibilitam um escaneamento completo do corpo. Para a melhor identificação e confirmação do sexo feminino a identificação da parte circular interna da gônada antes da visualização da glândula mamária e dos tetos é necessária, sendo assim os fetos do sexo feminino podem ser identificados antes dos 118 dias de gestação. A posição das gônadas em ambos os sexos é similar em quase toda a gestação, sendo diferente após 270 ou 300 dias nos machos quando as gônadas começam a migrar para o canal inguinal e lá permanecem até o parto (RENAUDIN et al., 1997; LIVINI, 2010) (Fig.8).

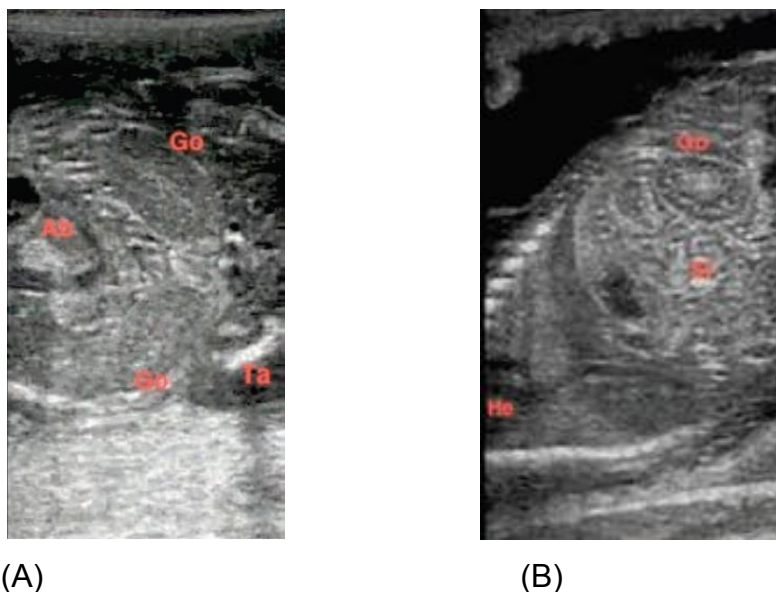


Figura 8: (A) Macho com 107 dias de gestação. (B) Fêmea com 95 dias de gestação. Ab, abdômen; Go, gônadas; Ta, cauda; He, coração; Si, intestino delgado. Fonte: Livini (2010).

O tempo necessário para realizar o exame varia de 2 a 15 minutos, dependendo basicamente da experiência do examinador, posicionamento e movimentação do feto, qualidade do equipamento, baixa luminosidade, posicionamento do ultrassom na altura dos olhos do examinador e égua que tolere bem o exame conseguindo ao máximo não se movimentar durante o mesmo. Fetos muito ativos dificultam o diagnóstico para examinadores com pouca experiência, as estruturas dos membros posteriores podem interferir na produção adequada da imagem. Gravar o exame é uma ótima alternativa para auxílio no diagnóstico por oferecer chance de uma observação mais detalhada (BUCCA, 2005; CURRAN & GINTHER, 1989).

A sexagem pela identificação das gônadas pode ser considerada superior em relação à sexagem fetal pelo tubérculo genital devido algumas características como: para a identificação do tubérculo genital é necessária maior experiência e a janela para a identificação é muito curta sendo de apenas nove dias; para identificação das gônadas o feto está maior sendo mais fácil a identificação das estruturas; oportunidade para identificar mais de um órgão para confirmar o diagnóstico (RENAUDIN et al., 1997; LIVINI, 2010).

2.3 SEXAGEM ATRAVÉS DO DNA FETAL LIVRE CIRCULANTE

O mais recente método para a sexagem fetal em equinos é através da reação em cadeia da polimerase (PCR) que fornece resultados sensíveis, precisos, confiáveis e rápidos (HAN et al., 2010). Isto porque a diferenciação sexual é determinada pela presença do cromossomo Y e pela expressão do gene SRY (*sex determining region Y*). As gônadas femininas continuam seu desenvolvimento com a ausência destes fatores (HAN et al., 2010; PIPREK, 2010).

PEIPPO et al.,(1995); CHOI et al.,(2010) realizaram a sexagem com base na PCR para a identificação do sexo de embriões equinos, onde a sexagem foi descrita com os genes SRY e AMELX-ALMEY (HASEGAW et al., 2000) e ZFX/ZFY (PEIPPO et al., 1995).

Esta técnica se baseia na detecção do cromossomo Y onde está o gene SRY. Este fragmento de DNA determina o sexo do animal. Codifica a proteína TDF (fator de determinação testicular) que vai agir nos tecidos gonadais, dando origem aos testículos. O TDF é uma proteína que age como gatilho na porção reguladora para a expressão deste gene na gônada indiferenciada para que deixe de ser ovário e passe a ser testículo. Com a ação do TDF há a atrofia dos ductos de Müller; o desenvolvimento da gônada masculina, formação de túbulos seminíferos, formação das células Leydig e produção de testosterona (DAMIANI et al., 2000).

LO et al., (1999) relatam a presença de DNA fetal livre circulante (ccffDNA) no plasma de mulheres grávidas. O diagnóstico pré-natal pode ser determinado pelo material genético presente no plasma de mãe sendo possível determinar o sexo do feto podendo ser um método alternativo para tal identificação(AKOLEKAR et al., 2010).

Os equinos tem a placenta do tipo epiteliocorial, com padrão de vilosidades coriônicas difusas completas onde não há comunicação da circulação materna com a circulação fetal (DYCE et al., 2002). Sendo assim, acredita-se que células fetais que sofreram lise celular resultando danos físicos, imunológicos e/ou apoptose possam ultrapassar as barreiras placentárias e então incorporar o

plasma da mãe oferecendo assim uma forma menos invasiva para o possível diagnóstico do sexo animal pré-parto (LEON et al., 2012).

LEON et al. (2012) executaram ensaios de PCR para detecção e extração do ccffDNA no plasma de éguas prenhas no terço final de gestação para determinar o sexo fetal através da identificação do gene SRY, além de validarem através da re-amplificação do produto de PCR e PCR quantitativo em tempo real (qPCR) e com um grupo o controle.

Para o exame é necessária à colheita de sangue em tubos com anticoagulante onde posteriormente serão centrifugadas duas vezes, a primeira com intuito de separar o plasma, depois será recentrifugado para separação dos detritos. O plasma obtido armazenado e fracionado em recipientes de 0,5mL e a menos 80°C por no máximo dois dias. O DNA então é extraído para a detecção e ampliação da sequência do cromossomo Y que foi desenhado através de um software para obter o par de *primers* pela sequência já existente de *Equus caballus* no *GenBank* (LEON et al., 2012).

Em todas as análises existiu um grupo controle, sendo um controle negativo com DNA feminino e outro positivo com DNA masculino diluído a 2% em DNA feminino padronizando as corridas. As análises eram re-amplificadas visando aumentar a quantidade de fragmentos do DNA denominada de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) (LEON et al., 2012)

Nas análises para identificar a presença do SRY a eficiência foi de 85%, sensibilidade de 72,7%. Na re-amplificação a eficiência foi de 95% e a sensibilidade 90,9%. A especificidade foi de 100% identificando as fêmeas. (LEON et al., 2012).

O plasma materno com fetos femininos é marcado pela ausência do cromossomo Y. Entretanto no diagnóstico por PCR pode ocorrer incapacidade de detecção do DNA circulante fetal podendo as éguas estar gestando fetos masculinos. Devem ser testadas alternativas para minimizar as falhas, como maior volume de plasma e testes mais sensíveis. O qPCR tem maior sensibilidade detectando número baixo de cópias de DNA, fazendo diferença em gestações em estágios iniciais (LEON et al., 2012).

A presente identificação do sexo pelo DNA circulante fetal, foi realizada em éguas no terço final de gestação. Outros trabalhos estão sendo realizados

para melhorar a sensibilidade do mesmo e determinar o menor período de gestação em que é possível detectar a ccffDNA em concentrações satisfatórias para detecção molecular do sexo em fetos equinos (LEON et al., 2012).

3. CONCLUSÃO

As técnicas de sexagem pelo tubérculo genital assim como pelas gônadas e genitálias externas dependem do conhecimento anatômico e das estruturas identificadas pelo examinador, posicionamento do feto, equipamento de qualidade, período ideal para a identificação de cada estrutura, entre outros. Para a identificação do tubérculo genital a melhor idade é entre 58 e 69 dias de gestação, para identificação da gônada e genitália a melhor fase é entre 100 e 130 dias de gestação. A determinação do sexo pelo DNA fetal livre circulante mostra que é possível à identificação utilizando a técnica de PCR, porém ainda deve ser aprimorado para permitir a identificação no terço inicial ou médio da gestação podendo então ser uma técnica de melhor aplicabilidade do que as outras uma vez que diminuem os fatores que dificultam a sexagem.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKOLEKAR, R. ; FARKAS, D. H.; VANAGTMAEL, A. L.; BOMARD, A. T.; NICOLAIDES, K. H. Fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccffDNA) at 11 to 13 weeks of gestation. *Prenat Diagn*, v.30, p.918-923, 2010.

BUCCA, S. Equine fetal gender determination from mid- to advanced- gestation by ultrasound. *Theriogenology*, v.64, p.568-571, 2005.

CHOI, Y. H.; GUSTAFSON- SEABURY, A.; VELEZ, I. C.; HARTMAN, D. L.; BLISS, S.; RIERA, F.L .; ROLDÁN, J. E.; CHOWDHARY, B.; HINRICHS, K. Viability of equine embryos after puncture of the capsule and biopsy for preimplantation genetic diagnosis. *Reproduction*, v.140, p.893-902, 2010.

CURRAN, S.S.; GINTHER, O. J.; Ultrasonic diagnosis of equine fetal sex by location of the genital tubercle. *Equine Vet Sci*, v.9, p.77-83,1989.

DAMIANI, D.; DICHTCHEKENIAN, V.; SETIAN, N.; O Enigma da Determinação Gonadal - O que existe Além do Cromossomo Y? *Arq Bras Endocrinol Metab*, v.44, p.248-256, 2000.

DYCE, K. M.; SACK, W.O.; WESING, C.J.G. Tratado de anatomia veterinária. 3.ed. São Paulo: Ed. ELSEVIER, 2002. 813p.

HAN, S. H.; YANG, B. C.; KO, M. S.; OH, H. S.; LEE, S. S.; Length difference between equine ZFX and ZFY genes and its application for molecular sex determination. *J Assist Reprod Genet*, v.27, p.725-728, 2010.

HASEGAW, T.; SATO, F.; ISHIDA, N.; FUKUSHIMA, Y.; MUKUOYAMA, H. Sex determination by simultaneous amplification of equine SRY and amelogenin genes. *J Vet Med Sci*, v.62, p.1109-10, 2000.

HOLDER, R. D. Fetal sex determinations in the mare between 55 and 150 days gestation. In: American Association of Equine Practitioners Annual Convention, 46, 2000, San Antonio. Anais eletrônicos...[online] San Antonio: Texas, 2000. Disponível em <http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2000/321.pdf>. Acesso em 30 jun. 2012.

LEON, P. M. M.; Campos, V. F.; DELLAGOSTIN, O. A.; DESCHAMPS, J.C.; SEIXAS F. K.; COLLARES, T. Equine fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccffDNA), *Theriogenology*, v.77, p.694-698, 2012.

LIMA, R. A. S.; OLIVEIRA, R. A.; Mendes, C. Q. Perfil e tendências da equideocultura brasileira. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 49, 2012, Brasília. *Anais...Brasília*, 2012. CD-ROM.

LIVINI, M. Determination of Fetal Gender by Transrectal Ultrasound Examination: Field's Experience. In: American Association of Equine Practitioners Annual Convention, 56, 2010, Baltimore. *Anais eletrônicos...*[online] Baltimore: Maryland, 2010. Disponível em <http://www.cabi.org/cabdirect/FullTextPDF/2011/20113042293.pdf>. Acesso em 30 jun. 2012.

LO, Y. M.; CORBETTA, N.; CHAMBERLAIN, P. F.; RAI, V.; SARGENT, I.L.; REDMAN, C. W.; WAINSCOAT, J. S. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, v.350, p.485-487, 1997.

MARI, G.; CASTAGNETTI, C.; BELLUZI, S.. Equine fetal sex determination using a single examination under farm conditions. *Theriogenology*, v.58, p.1237-1243, 2002.

NAVES, C.S.; VIEIRA, R. C.; DINIZ, E.G.; JACOMINI, J. O.; BELLETI, M. E.; OLIVEIRA, R.C. Desenvolvimento morfológico dos ovários em fetos equinos sem raça definida. *Ciência Rural*, v.38, p.416-422, 2008.

PIPREK, R. P.; Molecular and cellular machinery of gonadal differentiation in mammals. *Int J Dev Biol*, v.54, p.779-786, 2010.

PEIPPO, J.; HUHTINEN, M.; KOTILAINEN, T. Sex diagnosis of equine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. *Theriogenology*, v.44, p.619-627, 1995.

RENAUDIN, C.D.; GILLIS, C.L.; TARANTAL, A. F. Transabdominal Combined With Transrectal Ultrasonographic Determination of Equine Fetal Gender During Midgestation. In: American Association of Equine Practitioners Annual

Convention,43, 1997, Phoenix. Anais eletrônicos...[online] Phoenix: Arizona, 1997. Disponível em <http://www.ivis.org/proceedings/aaep/1997/Renaudin.pdf>. Acesso em 30 jun. 2012.

RENAUDIN, C. D. Ultrasonographic Determination of Equine Fetal Gender. In: Recent Advances in Equine Theriogenology, 2000 [online]. Disponível em http://www.ivis.org/advances/reproduction_ball/fetal_sexing_renaudin/ivis.pdf. Acesso em 30 jun. 2012.

5. RELATÓRIO DE ESTÁGIO

O estágio supervisionado teve início em quatro de setembro e final em sete de dezembro de 2012. Acompanhando o Médico Veterinário Carlos Augusto Salvagni, CRMV-8 1670/5. O estágio foi realizado em sua central de reprodução equina: Caballus Central de Reprodução Equina, em Abadia de Goiás – GO, no antigo Haras Luar e em fazendas e haras que o mesmo atende no estado de Goiás, nas áreas de reprodução, clínica e cirurgia equina.

5.1 ATIVIDADES REALIZADAS

Na central foram realizadas atividades como: controle folicular de doadoras e receptoras, com confirmação de prenhez a partir de quatro dias após a ovulação nas receptoras por transferência de embrião; controle folicular para inseminação artificial com sêmen congelado ou refrigerado com confirmação de prenhez 12 dias após a inseminação. Nos casos de sêmen congelado com 13 dias após a inseminação (considerando o dia da inseminação como D0); lavagem uterina; hospedagem de animais; curativos após cirurgias (Quadro 1).

As atividades realizadas nas fazendas e haras assistidos incluíram também diagnóstico de gestação, exame para compra de receptoras, atendimento para alinhamento dentário, cirurgias em geral, que foram possíveis de realização a campo (Quadro 1).

QUADRO DE ATIVIDADES

ATIVIDADES	QUANTIDADE
Controle de doadoras	44
Controle de receptoras	90
Controle folicular	153
Lavagem uterina	04
Transferência de Embrião	17
Diagnóstico de gestação	133
Colheita e Análise de sêmen	07
Inseminação Artificial (sêmen congelado)	03
Inseminação Artificial (sêmen refrigerado)	42
Exame para compra de receptoras	14
Orquiectomia	06
Coleta e envio de sêmen	02

QUADRO DE ATIVIDADES (CONTINUAÇÃO)

Congelamento de sêmen	02
Herniorrafia	03
Cauterização de Sarcoide	01
Cirurgia de Membros Posteriores	02
Grosa para alinhamento dentário	10

QUADRO 1 – Atividades desenvolvidas no estágio curricular realizado na Central de Reprodução Equina Caballus, fazendas e haras da região do estado de Goiás, de 03 de Setembro a 07 de Dezembro de 2012

A Central era dirigida pelos veterinários responsáveis, Carlos Augusto Salvagni e Andreia Cristiane da Costa Monteiro.

A central possui dois pavilhões com um total de 34 baias, todas com bebedouro, comedouro e local para feno. As camas das cocheiras eram de palha de arroz. Também possuía um laboratório equipado com geladeira, microscópio, lupa estereoscópica, mesa aquecedora, forno microondas, autoclave, armário de remédios e matérias utilizados na reprodução; escritório; um apartamento para estagiário com cama, banheiro, sofá e televisão; sala de ração com estrados de madeira para que a mesma não fique em contato com o piso evitando umidade e roedores; selaria.

Uma lanchonete com 12 bretes e com dois troncos de contenção no mesmo pátio; dois redondeis com cinco metros de raio, sendo um gramado e outro com areia; uma pista de laço iluminada com bretes e embarcadouro; sete piquetes com uma área total de 15 hectares, e tamanhos variados; um troco coberto.

Os animais ao chegarem eram pesados com a fita de pesagem e recebiam 1% de seu peso vivo de ração e feno divididos em duas refeições diárias. Os animais dos piquetes também recebiam a mesma alimentação, porém com quantidade inferior de feno.

5.2. CONTROLE FOLICULAR E MANIPULAÇÃO FARMACOLÓGICA DO CICLO ESTRAL.

Realizado com o intuito de auxiliar no diagnóstico da ovulação bem como acompanhar o ciclo estral por completo a fim de ajudar a planejar as futuras prenhez. Foi o primeiro passo para as transferências de embriões ou simplesmente para a inseminação artificial. Detectando o que seria o melhor momento para a cobertura, agilizando o processo de produção de potros.

O controle folicular levou em consideração a individualidade de cada animal. Foi utilizado um aparelho de ultrassonografia portátil, modelo *Aloka SSD500* durante toda a estação de monta de 2012/2013 acompanhada. As éguas foram examinadas, levando em consideração tamanho e número de folículos ovarianos, consistência dos folículos, tônus uterino e integridade uterina, presença ou não de líquido e presença ou não de cisto(s) uterinos.

Os animais foram contidos em bretes, para restringir a movimentação; com a mão devidamente enluvada e lubrificada com carboximetilcelulose foi realizada a palpação retal seguida sempre por ultrassonografia transretal. Todos os dados foram anotados e datados em tabelas e cadernos individuais de cada propriedade, ajudando na organização e visualização de como estavam os planteis, determinando as estratégias que seriam usadas posteriormente, dependendo do interesse e planos dos proprietários.

As fêmeas já ovuladas, com corpo lúteo (CL) bem formado, e com mais de cinco dias de ovulação, em sua grande maioria responderam a tratamentos com Prostaglandinas (PGF2 α), (1mL/animal, IM, Lutalyse¹ ou Ciosin²), promovendo a lise do corpo lúteo e iniciando um novo ciclo em aproximadamente três dias. A ovulação na maioria das éguas ocorreu com sete a dez dias após a aplicação do medicamento.

Nas maioria das éguas com folículos dominantes a partir de 35 mm receberam tratamento com Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG), (Vetecor³, 2500 UI/animal, IV,), e análogos do Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH) como a Deslorelina (Sincrorrelin⁴, 3mL/animal, IM). Após a administração dos

¹ Lutalyse – Proprietário: Laboratórios Pfizer Ltda. Guarulhos, São Paulo, Brasil.
Fabricante: Ouro Fino Saúde Animal Ltda. Cravinhos, São Paulo, Brasil

² Ciosin – Proprietário: Intervet do Brasil Veterinária Ltda. Cruzeiro, São Paulo, Brasil.
Fabricante: Ouro Fino Saúde Animal Ltda. Cravinhos, São Paulo, Brasil

³ Vetecor - Proprietário e Fabricante: Laboratório Calier S.A. Les Franqueses del Vallès, Barcelona, Espanha.

⁴ Sincrorrelin – Ourofino Saúde Animal Ltda. Cravinhos, São Paulo, Brasil.

indutores de ovulação, as éguas com folículos responsivos ovularam em aproximadamente 36 horas após a administração. A inseminação com sêmen fresco ou refrigerado ocorreu sempre na manhã ou na tarde do dia seguinte, com aproximadamente 24 horas após a administração do medicamento.

5.3. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Após o acompanhamento do desenvolvimento folicular e a indução da ovulação as éguas eram cobertas por monta natural ou inseminadas com sêmen refrigerado ou sêmen congelado.

Nos casos das inseminações artificiais por sêmen refrigerado, eram realizadas com 24 horas após a aplicação do indutor de ovulação. A égua era colocada no brete, era realizado um exame ultrassonográfico para detecção do folículo pré-ovulatório. Depois tinha a base da cauda enfaixada, a região do períneo lavado com detergente neutro e água então a região era seca com papel toalha. A pipeta era preparada de forma a ser preenchida pelo sêmen evitando que fosse introduzido ar no útero.

Com a mão devidamente enluvada de preferência do avesso a pipeta de inseminação era colocada entre os dedos e introduzida angulada na vagina evitando que entrasse no meato urinário, com um dos dedos a cérvix era localizada e então a pipeta era introduzida até o fundo do corpo útero onde era levemente tracionada e o sêmen era depositando no corpo do útero. Após a retirada da pipeta era realizada uma leve massagem no clitóris.

No caso da inseminação por sêmen congelado, a inseminação era feita logo após a identificação da ovulação. 24 horas após a indução da ovulação era realizado um controle folicular de seis em seis horas durante o dia, a partir das 22 horas o controle era realizado de duas em duas horas, mas também alguns foram realizados de seis em seis horas.

Para a inseminação com sêmen congelado após a identificação da ovulação, a égua era prepara da mesma forma que as éguas por inseminação artificial com sêmen refrigerado. Seis a oito palhetas de sêmen eram descongeladas em banho-maria a 38°C por 20 segundo. Uma gota de sêmen era então colocado em uma lâmina com lamínula previamente aquecidas a 38°C e

então observada no microscópio eletrônico , tendo no mínimo três de motilidade 30% de vigor. As palhetas eram levadas até a égua. Com a mão enluvada e o inovulador entre os dedos era introduzido na vagina angulado evitando atingir o meato urinário, com um dos dedos identificava-se a cérvix e então o inovulador era introduzido no útero e o conteúdo das palhetas eram depositados no mesmo.

5.4. TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO

Depois de realizar o controle folicular, a inseminação e a sincronização da doadora com as receptoras. A colheita do embrião ocorreu entre o sétimo (D7) e o oitavo dia (D8) após a ovulação, considerando o dia da ovulação como dia zero (D0). Nas éguas inseminadas com sêmen congelado a colheita era realizada em D8 ou no nono dia (D9) pós-ovulação. No caso da receptora, eram escolhidas as que tinham ovulação entre os dias cinco (D5) e o oito (D8) pós-ovulação, no dia da colheita da doadora. Quando a receptora encontrava-se entre os dias nove (D9) e doze (D12) de ovulada, era feita a administração de Progesterona (P4) (10 mL/animal, IM, Afisterone⁵), após a inovulação e uma vez por semana durante doze semanas, auxiliando na manutenção da prenhez. Nos casos que a receptora estivesse com dois dias de ovulação (D2) era inovulada e logo aplicado P4 criando um “ambiente” uterino semelhante a D5.

Para as colheitas de embriões foram utilizados os seguintes materiais: sonda de lavagem uterina (tipo bivona), adaptador em “Y”, filtro coletor, solução Ringer Lactato, lupa, placa de Petri, seringas de 20mL, agulha (40x1,20 mm), meio de lavagem e manutenção do embrião (Holding), palhetas de 0,5mL, pipeta de inseminação artificial para equinos ou inovulador metálico bovino dependendo de qual material estava disponível.

O adaptador era conectado a sonda de lavagem, filtro coletor e a solução de ringer. Com a mão enluvada e devidamente lubrificada estendia-se a ponta entre o polegar e a palma da mão, assim que a cérvix era localizada a sonda era introduzido no útero. O balão era inflado com 30 mL de ar e a sonda tracionada para trás assegurando-se de que estava na posição adequada. A mão enluvada então era colocada no reto para acompanhar a lavagem uterina, onde

⁵ Afisterone 1% – Hertape Calier Saúde Animal S/A. Juatuba, Minas Gerais, Brasil.

eram realizadas massagens e acompanhamento para que não deixasse o órgão muito distendido causando qualquer desconforto para o animal. Usava-se 1,5 L de Ringer Lactato por lavagem, e eram realizadas duas lavagens.

Após a lavagem uterina, uma pequena quantidade de líquido ficava no filtro coletor para evitar que o possível embrião aderisse à tela ou parede do filtro. O conteúdo do filtro era colocado em uma placa de Petri e então era lavado com uma seringa (20 mL) e agulha (40x1,20mm) carregada com Ringer Lactato. A placa de Petri era riscada com caneta ou a própria agulha para orientar a procura e visualização com a lupa. A Procura do embrião era feita por toda a placa, preferencialmente em formato de “U” e “U invertido” evitando que qualquer local ficasse sem ser observado. Após identificar o embrião, a busca continuava até toda a placa ser percorrida certificando-se de que não haveria mais de um embrião.

Com uma seringa de 1 mL acoplada a uma palheta de 0,25 ou 0,5mL o embrião era retirado da placa e colocado em outra placa de Petri, já preparada com no mínimo nove gotas de solução tamponada (SYNGRO Holding⁶, Holding Plus 0,4%⁷) para proceder a lavagem do mesmo passando-o gota a gota evitando que qualquer célula da doadora ficasse aderida ao embrião para não provocar uma situação de corpo estranho na receptora causando uma reação inflamatória levando a morte deste. Após passar pela lavagem, o embrião era envasado do embrião em palheta de 0,5 ou 0,25 mL, ou pipetas de inseminação, de forma a conter uma coluna de meio, uma coluna com ar, uma coluna de meio mais o embrião, outra coluna de ar e por fim mais uma coluna de meio no caso das palhetas, tomando sempre o cuidado para que a primeira coluna encostasse na bucha que se encontra em uma das pontas da palheta evitando que está perca o seu conteúdo. Se o envase ocorria na pipeta as colunas eram colocadas de forma a percorrer mais a mesma evitando perder o conteúdo. A palheta era colocada dentro do inovulador e só então conduzidos até a receptora.

A receptora já contida, com a base da cauda enfaixada, tinha a região do períneo lavada com detergente neutro ou iodopovidona degermante e depois a região era seca com toalhas de papel. Com a mão enluvada (preferencialmente

⁶ SYNGRO Holding – Bioniche Animal Health USA, INC. Pullman, WA, United States.

⁷ Holding Plus 0,4% - Vitrocell. Campinas, São Paulo, Brasil.

com a luva pelo avesso) e lubrificada (lubrificante vaginal estéril) posicionava-se a pipeta abaixo dos dedos e a introduzia dentro da vagina, passando os lábios vulvares com angulação para evitar introduzir o inovulador ou a pipeta no meato urinário. Identificava-se a cérvix, com um dos dedos e a pipeta era introduzida até o corpo do útero, local onde era depositado o embrião. O uso do inovulador ou da pipeta dependia não só do tamanho do embrião, mas também de qual dos dois materiais estava disponível no momento da inovulação deste. O uso da pipeta dava-se mais com embriões maiores e quando só este material era disponível.

Após a colheita, a doadora recebia PGF2 α (mesma dose anterior) causando então a lise do CL iniciando um novo ciclo estral para que fosse realizado nova cobertura/inseminação artificial, no momento correto ou para gestação. Esse procedimento também era evitado que ocorresse uma gestação caso o embrião não fosse coletado na lavagem.

Foram coletadas doadoras de diferentes faixas etárias sendo a mais nova com dois anos de idade e a mais velha com 28 anos. Os animais de até 14 anos foram coletados entre D7 e D8, no caso de animais mais velhos a coleta foi realizada em D8 e D9 uma vez que se sabe que estes animais tem um desenvolvimento embrionário tardio, sendo assim a colheita era realizada um pouco mais tarde.

Para cada doadora foram examinadas cerca de duas ou três receptoras, o que aumentou as chances de sincronização de ovulação, podendo escolher aquela com os melhores parâmetros no momento da inovulação do embrião. Para a transferência levou-se em consideração também as características morfológicas e zootécnicas da receptora uma vez que o tamanho do feto e da receptora interferem e muito no seu desenvolvimento.

5.5. COLHEITA DE SÊMEN

Para obtenção do sêmen para o congelamento era realizada a colheita do mesmo. Para tal, procedia-se a montagem da vagina artificial, que consiste no tubo rígido, tubo flexível, camisa sanitária, copo coletor graduado e filtro de náilon. Adicionava-se água aquecida para que a temperatura interna estivesse entre 42 a 45°C, adicionando a água com uma temperatura de aproximadamente 50°C uma

vez que há perda de temperatura para o meio. A pressão interna deveria estar apropriada, podendo ser aferida introduzindo o braço com luva de palpação, o mesmo deveria ter alguma resistência ao entrar. Um lubrificante não espermicida foi utilizado para auxiliar a penetração do pênis na vaginal artificial.

Os garanhões realizaram o salto ou em uma fêmea que se encontrava em estro ou então uma fêmea mais calma que tolerasse o procedimento sem machucar o garanhão, o veterinário ou mesmo os funcionários das propriedades os quais estavam auxiliando a colheita. O garanhão era conduzido até a égua através de um cabresto. Antes da colheita, caso o animal estivesse muito tempo sem cobrir era realizada uma lavagem peniana com água morna com temperatura entre 38 a 40°C, retirando então o esmegma acumulado. Para proceder a lavagem o garanhão foi conduzido próximo da fêmea já preparada para que pudesse então expor o pênis e ser feita a lavagem peniana.

A fêmea era contida com cabresto e peias (cordas), que eram fixadas nos membros pélvicos (articulação interfalangeana, falanges proximal e média, zootecnicamente denominado: quartelas) e amarrados em uma peiteira, com o cuidado de deixar as mesmas passando pela parte interna dos membros torácicos. A base da cauda era enfaixada e amarrada de forma a se encontrar entre os membros pélvicos dificultando a cópula.

Para a colheita de sêmen o garanhão era conduzido até a égua podendo então expressar todas as fases da cópula como aproximação, reflexo de Flehmen, excitação. Logo após a monta o pênis era desviado e introduzido na vagina artificial. A ejaculação era observada pelos movimentos da cauda.

5.6. CONGELAMENTO DE SÊMEN

Após a colheita era realizado os exames imediatos: volume, aspecto (cor e densidade), motilidade e vigor. Uma gota era diluída em 19 gotas de água para realizar então a concentração, colocando a diluição em uma câmara de Neubauer sendo preenchida por capilaridade.

Imediatamente após as análises, o ejaculado era diluído na proporção de 1:1 com diluente tipo Kenney (BotuSêmen⁸), a temperatura ambiente. O volume resultante era colocado em tubos de centrifuga de 15 mL e então centrifugados por dez minutos, formando um *pellet* de espermatozoides no fundo do tubo.

Para saber a quantidade de palhetas que seriam congeladas:

$$\text{Volume do sêmen (mL)} \times \text{Motilidade (\%)} \times \text{Concentração (x10}^6\text{/mL)} = Y$$

Y = Quantidade de espermatozoides vivos

Cada palheta de 0,5 ml deveria conter no mínimo 100 milhões (100x10⁶) de espermatozoides.

$$1 \text{ palheta} \text{ ----- } 100 \times 10^6$$

$$N \text{ palhetas} \text{ ----- } Y$$

N = número de palhetas

Após a centrifugação, o sobrenadante era retirado. Para confirmar a concentração e a quantidade de palhetas foram refeitos os cálculos de concentração para conferência dos dados. Só então era adicionado o crioprotetor (BotuCrio⁹) de modo a ter o volume certo para preencher todas as palhetas.

$$1 \text{ palheta} \text{ ----- } 0,5 \text{ mL}$$

$$N \text{ ----- } Z \text{ mL}$$

Z= quantos mL de crioprotetor devem ser adicionados para preencher todas as palhetas.

As palhetas eram identificadas com o nome do garanhão, registro, raça e data da colheita. Após a identificação as palhetas foram envasadas e lacradas com álcool polivinílico. Uma coluna no centro das palhetas era sempre deixada a fim de evitar que a mesma rompesse quando fosse descongelada.

Antes do congelamento o sêmen era estabilizado 5°C por um tempo 30 minutos a 1 hora em geladeira com temperatura controlada. Depois as palhetas foram transferidas para uma caixa de isopor que continha nitrogênio líquido onde foram mantidos a seis centímetros deste por 20 minutos, sendo então mergulhado

⁸ BotuSêmen – Botupharma Ind. e Com. de Produtos Veterinários Ltda. Botucatu, São Paulo, Brasil.

⁹ BotuCrio - Botupharma Ind. e Com. de Produtos Veterinários Ltda. Botucatu, São Paulo, Brasil.

no nitrogênio líquido. Com uma pinça longa foram retiradas do nitrogênio e colocadas em raques metálicas e posteriormente em canecas dentro do botijão de sêmen em menor tempo possível para que não ocorresse recristalização uma vez que a técnica de congelamento tenta ao máximo não promover a cristalização evitando romper as membranas dos espermatozoides.

Após o congelamento uma palheta era descongelada e analisada. Para descongelar a mesma era imersa em banho-maria a uma temperatura de 38°C por 30 segundos. Na análise microscópica deveria ter no mínimo 30% de motilidade e vigor três. Se os parâmetros estivessem abaixo do recomendado o sêmen não poderia ser utilizado para inseminação sendo descartado.

6. CONCLUSÃO

Por meio do acompanhamento das atividades descritas neste relatório, foi possível confirmar que tanto conhecimentos teóricos quanto práticos são necessários para um bom desempenho, mas é importante saber adaptar esses conhecimentos às necessidades. Com o tempo a maioria dos profissionais acaba por se acomodar e deixar de lado algumas práticas de grande importância, principalmente no quesito higiene. O estágio foi de grande valia, ampliando conhecimentos e incitando maior senso crítico.